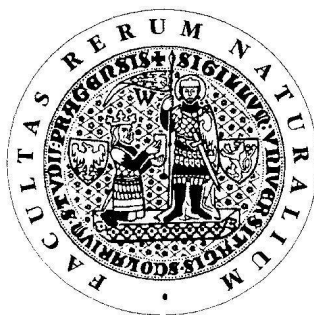


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Šímová

Optimalizace separace derivátů penicilinu metodou  
HPLC

Optimization of HPLC separation of penicillin  
derivatives

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2011

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, výzkumný projekt č. 1M06011: „Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí“ a dlouhodobého výzkumného záměru MŠMT ČR, projekt č. MSM0021620857.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2011.

## Abstrakt

Peniciliny patří mezi  $\beta$ -laktamová antibiotika, která jsou velice rozšířená v humánním i veterinárním lékařství. Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a optimalizovat HPLC metodu pro separaci čtyř derivátů penicilinu - amoxicilinu, 4-hydroxyfenoxymethylpenicilinu, benzylpenicilinu a fenoxymethylpenicilinu. Byl vybrán reverzní mod HPLC s oktadecylovou stacionární fází. Za podmínek izokratické eluce se nepodařilo rozseparovat všechny analyty až na základní linii. Z tohoto důvodu byla použita gradientová eluce, při které se podařilo rozseparovat všechny analyty na základní linii do 22 minut. Během experimentu byla také studována stabilita methanolických roztoků penicilinů v průběhu několika dní pomocí HPLC.

**Klíčová slova:** HPLC, antibiotika, deriváty penicilinu, reverzní mod, stabilita

## Abstract

Penicillins are part of  $\beta$ -lactam antibiotics, which are wide spread in human and veterinary medicine. The aim of this bachelor work was to develop and to optimize HPLC method for separation of four derivatives of penicillin - amoxicillin, 4-hydroxyphenoxymethylpenicillin, benzylpenicillin and phenoxymethylpenicillin. The reserved phase HPLC with octodecyl stationary phase was used in this work. The baseline separation of all analytes was not obtained in isocratic elution. For this reason, the gradient elution was examined on the baseline resolution of all analytes was achieved and the analysis time did not exceed 22 minutes. The stability of methanolic solutions of penicillins was tested during eight days.

**Key words:** HPLC, antibiotics, derivatives of penicillins, reverse mod, stability

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Květě Kalíkové, Ph.D. za poskytnuté téma, všestrannou pomoc, cenné rady, ochotu a především trpělivost při řešení pro mě neobvyklých situacích. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemné atmosféry v laboratoři.

# Obsah

Prohlášení .....	2
Abstrakt .....	3
Klíčová slova .....	3
Poděkování .....	4
Obsah .....	5
Seznam zkratk .....	6
1. Úvod .....	7
2. Teoretický úvod .....	8
2.1. Charakteristika penicilinů .....	8
2.2. Historie .....	8
2.3. Chemická struktura penicilinů .....	9
2.4. Syntéza derivátů penicilinu .....	10
2.5. Použití penicilinů .....	11
2.5.1. Lékařství .....	11
2.5.2. Chov hospodářských zvířat .....	12
2.6. Vstup penicilinů do životního prostředí .....	12
2.7. Degradace penicilinů .....	14
2.8. Metody stanovení penicilinů .....	14
2.8.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	16
3. Experimentální část .....	17
3.1. Přístroje a pomůcky .....	17
3.2. Použité chemikálie .....	18
3.3. Příprava vzorků .....	19
3.4. Použité mobilní fáze .....	19
3.5. Separační podmínky .....	20
4. Výsledky a diskuze .....	21
4.1. Výběr vlnové délky pro detekci .....	21
4.2. Optimalizace separace .....	22
4.2.1. Kolona Symmetry® C <sub>18</sub> .....	22
4.2.2. Kolona C <sub>18</sub> 5micron Spherical .....	22
4.3. Stabilita methanolických roztoků penicilinů .....	27
5. Závěr .....	31
Použitá literatura .....	32

## Seznam zkratk

4-HFMP	4-hydroxyfenoxymethylpenicilin
6-APA	6-aminopenicilanová kyselina
A	Absorbance
ACN	Acetonitril
AMOX	Amoxicilin
BP	Benzylpenicilin
CNS	Centrální nervový systém
FMP	Fenoxymethylpenicilin
Fosf. p.	Fosfátový pufr
Grad.	Gradientová eluce
H <sub>2</sub> O	Voda
HCOOH	Kyselina mravenčí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Izokr.	Izokratická eluce
$k$	Retenční faktor
MS	Hmotnostní spektrometrie
$R$	Rozlišení
RP-HPLC	Reversní mod vysokoúčinné kapalinové chromatografie
SPE	Extrakce tuhou fází
$t$	Retenční čas
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření
$Y$	Šířka píku při základně
$\lambda$	Vlnová délka

# 1. Úvod

Penicilin byl objeven Alexandrem Flemingem ve 20. letech 20. století. Největší rozmach v používání tohoto antibiotika nastal během druhé světové války, kdy se začala léčit dříve fatální onemocnění. Dnes se peniciliny používají více ve veterinární než v humánní medicíně.

Vytvoření rezistence bakterií je následkem častého používání penicilinů. Významný je také jejich výskyt v životním prostředí, což vede k vývoji a optimalizaci metod pro stanovení penicilinů v různých složkách životního prostředí.

Cílem této bakalářské práce je vyvinout a optimalizovat separaci derivátů penicilinu pomocí RP-HPLC, použitím různých kolon a mobilních fází. Jelikož peniciliny jsou nestabilní, je zde zařazeno i sledování jejich stability v průběhu několika dní.

V teoretické části jsou představeny peniciliny, jejich charakteristika, struktura, nejčastější použití, syntéza, degradace a metody jejich stanovení se zaměřením na HPLC.

## 2. Teoretický úvod

### 2.1. Charakteristika penicilinů

Peniciliny patří do skupiny antibiotik, které inhibují syntézu buněčné stěny. Jako antibakteriální léčiva jsou vhodná, protože lidské buňky buněčnou stěnu nemají. Tato farmaka působí na rostoucí a množící se mikroby baktericidně. Základní látkou této skupiny je penicilin G (benzylpenicilin).

Penicilin G má nevýhody, které jeho terapeutické využití omezují. Žaludeční kyselina štěpí  $\beta$ -laktamový kruh, a tím penicilin G inaktivuje.  $\beta$ -laktamový kruh štěpí také bakteriální enzymy, např. peniciliáza, kterou mohou produkovat především stafylokokové kmeny, které se pak stanou vůči penicilinu G rezistentní.<sup>1</sup> Spektrum jeho antibakteriálního účinku je úzké, zahrnuje grampozitivní bakterie, gramnegativní koky a původce syfilidy.

Deriváty penicilinu mají výhody. Nerozkládají se v kyselém prostředí, což umožňuje i perorální podávání. Jsou rezistentní vůči penicilináze a mají rozšířené spektrum účinku, např. amoxicilin poškozují četné gramnegativní mikroby.

Člověk peniciliny velmi dobře snáší. Nejdůležitější nežádoucí účinek je alergická reakce s projevy od kožní vyrážky až po anafylaktický šok. Pro zvláštní nebezpečí alergizace se peniciliny nesmějí používat lokálně. Neurotoxické účinky, většinou křeče, se mohou objevit tehdy, jestliže penicilin působí ve vysokých koncentracích na CNS.<sup>2</sup>

### 2.2. Historie

Britský bakteriolog Sir Alexander Fleming učinil během svého působení v bakteriologické laboratoři v Londýně obdivuhodný objev: známá a přirozená houba jménem *Penicillium notatum*, kterou lze najít například na zplsnivělém chlebu, nejenže zabraňuje růstu bakterií, ale dokáže je i usmrtit. První zprávu o svém objevu a jeho potencionálním využití zveřejnil Fleming roku 1929 v

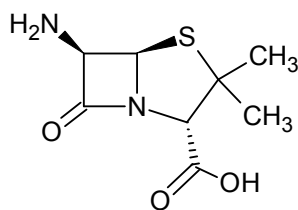


„British Journal of Experimental Pathology“.<sup>3</sup> Trvalo však deset let, než svět medicíny odhalil skutečný význam jeho výzkumu. Po druhé světové válce vznikly předpoklady pro farmaceutickou produkci antibiotika. Mnoho zraněných přežilo operace, amputace a rozsáhlá zranění, u nichž hrozilo nebezpečí infekce. Sulfonamidy, které dokážou zastavit růst bakterií, byly postupně nahrazeny jinými antibiotiky, jejichž prvním zástupcem byl penicilin.

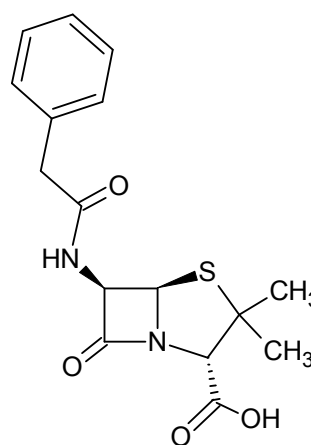
Sir Alexander Fleming získal roku 1945 společně se Sirem Howardem Floreyem a Ernstem Borisem Chainem Nobelovu cenu za medicínu.<sup>4</sup>

## 2.3. Chemická struktura penicilinů

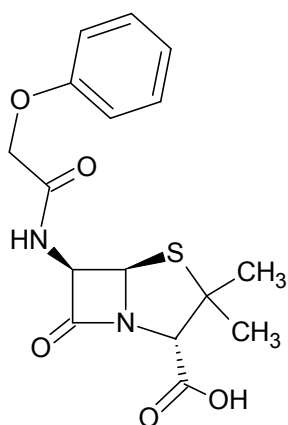
Chemická struktura antibiotik je široká, proto jsou rozděleny do mnoha skupin, ve kterých si jsou sloučeniny strukturně podobné. Základní strukturu penicilinového jádra představuje  $\beta$ -laktamový kruh, který je v přírodních penicilinech přes dusík a tetrahedrální uhlík vázaný k pětičlennému thiazolidinovému kruhu. Polosyntetické peniciliny jsou syntetizovány z 6-aminopenicilanové kyseliny.<sup>5</sup> Na obrázku č. 1 jsou uvedeny struktury derivátů penicilinu, které byly použity při výzkumu a 6-aminopenicilanové kyseliny.<sup>6</sup>



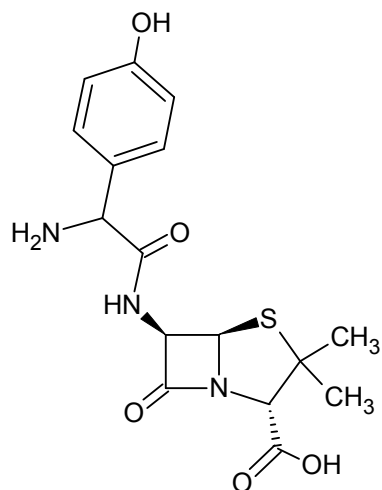
kyselina 6-aminopenicilanová



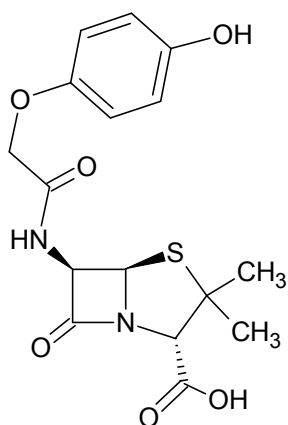
benzylpenicilin



fenoxymethylpenicilin



amoxicilin

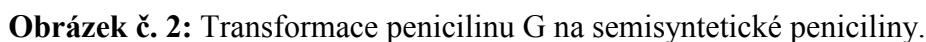


4-hydroxyfenoxymethylpenicilin

**Obrázek č. 1:** Struktury penicilinů.

## 2.4. Syntéza derivátů penicilinu

V dnešní době spočívá význam penicilinu G především v tom, že je prekurzorem řady semisyntetických penicilinů. Penicilin G se připravuje fermentačně, je získáván z bakteriální kultury *Penicillium chrysogenum*, poté se hydrolyzuje na kyselinu 6-aminopenicilanovou, jejíž derivatizací se získá požadovaný penicilin, jak je ukázáno na obrázku č. 2.<sup>7</sup>



## 2.5.2. Chov hospodářských zvířat

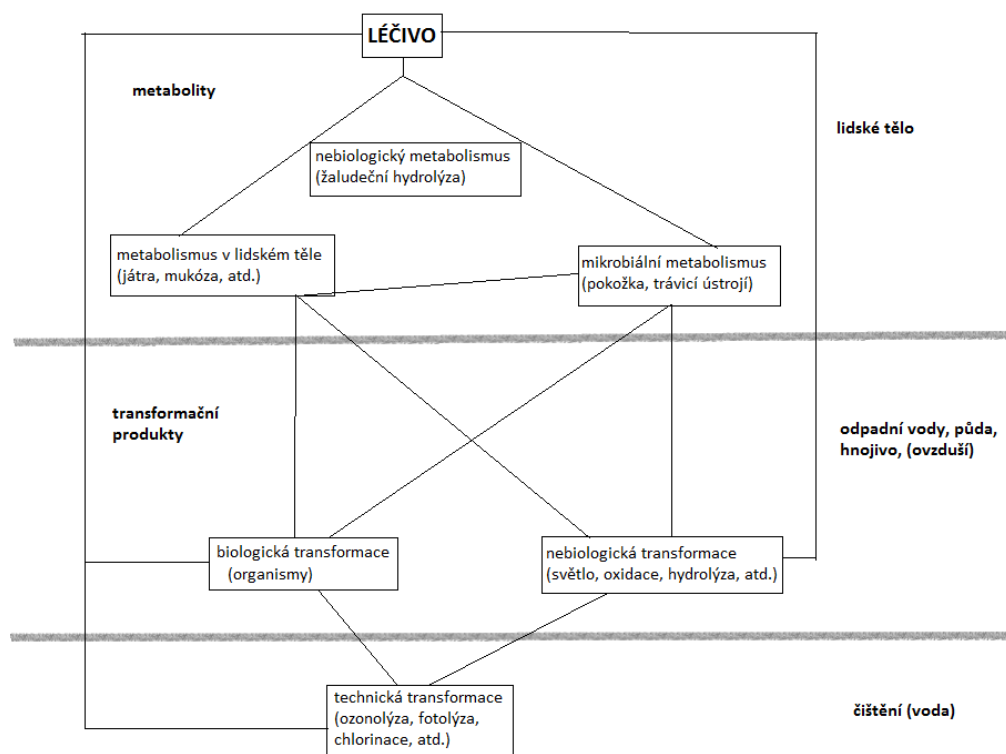
Peniciliny a  $\beta$ -laktamová antibiotika jsou rozsáhle používány ve veterinárním lékařství k léčbě a prevenci proti onemocněním. Následkem ale může být výskyt zbytků těchto antibiotik v jedlých tkáních hospodářských zvířat a následné zdravotní problémy jedinců přecitlivělých na peniciliny.<sup>9</sup> Také zde se objevuje rezistence bakterií na peniciliny.

Amoxicilin je jako širokospektrální antibiotikum velice rozšířen ve veterinární medicíně. Používá se k léčení bakteriálních infekcí způsobených grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Podává se buď perorálně rozpuštěný ve vodě, ale častěji v krmení kvůli nestálosti amoxicilinu ve vodném roztoku.<sup>10</sup>

## 2.6. Vstup penicilinů do životního prostředí

Zájem o tuto problematiku vzrostl v souvislosti s možným negativním dopadem působení léčiv na životní prostředí. Přispívá k tomu nejen jejich vysoká produkce a spotřeba, ale i nedostatečná likvidace systémy zpracovávajícími odpad a následné vyloučení do životního prostředí.<sup>11</sup> Léčiva i jejich metabolity mohou představovat ekotoxikologické riziko pro různé organismy.

Jednou z možných cest, odkud se peniciliny a obecně léčiva dostávají do životního prostředí, jsou zdravotnická zařízení. Léčiva jsou z organismu vyloučena buď v nezměněné formě, nebo jako metabolity. Značné koncentrace mohou obsahovat nemocniční odpadní vody, odpadní vody z průmyslové výroby nebo průsaky skládek odpadních vod. Pokud nejsou snadno degradovány v čistírnách odpadních vod, mohou způsobovat kontaminaci řek, jezer, podzemních vod a dokonce i vodovodní vody. Vstup léčiv, popř. metabolitů do životního prostředí ukazuje obrázek č. 3.<sup>12</sup>



**Obrázek č. 3:** Vstup léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí.

Další možnou cestou vstupu těchto látek do životního prostředí je kontaminace vodního prostředí odpadními systémy a zemědělskými odtoky. Exkrementy hospodářských zvířat obsahující antibiotika se často používají jako hnojivo na zemědělská pole, odkud mohou kontaminovat podzemní i povrchové vody.<sup>13</sup>

Polární antibiotika nejsou eliminována dostatečně efektivně v čistírnách odpadních vod, ale velké části eliminace je dosaženo absorpcí na aktivovaný kal. Tato absorpce je částečně zprostředkována hydrofobními interakcemi.<sup>14</sup> Zbytky antibiotik vyvolávají rezistenci bakteriálních kmenů, jejíž vzrůst byl pozorován zejména u bakterií v odtocích z nemocničních a farmaceutických zařízení, může představovat hrozbu pro lidské zdraví. Z uvedených důvodů se bakterie stávají necitlivé na peniciliny.<sup>15</sup>

## 2.7. Degradace penicilinů

$\beta$ -laktamový kruh je velice nestabilní a vysoce citlivý na pH, teplotu a působení  $\beta$ -laktamáz.<sup>16</sup> V závislosti na podmínkách (zejména hodnotě pH) vznikají různé degradační produkty, zejména kyseliny. Podrobný popis vzniklých degradačních produktů je uveden v práci od Deshpanda a kol.<sup>17</sup>

Z důvodů rozkladu  $\beta$ -laktamového kruhu působením enzymů ( $\beta$ -laktamáz) se k penicilinům přidávají inhibitory  $\beta$ -laktamázy, např. klavulanová kyselina, sulbactam.<sup>18</sup>

## 2.8. Metody stanovení penicilinů

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení penicilinů z různých matric je HPLC<sup>19</sup> (viz dále) a nově i UPLC<sup>20</sup>, s různými metodami detekce (např. spektrofotometrická detekce v UV-VIS oblasti, hmotnostní spektrometrie, atd.).

Protože se peniciliny vyskytují v životním prostředí, ve kterém se často stanovují, jen ve velmi malých koncentracích, před vlastním stanovením se ze vzorku prekoncentrují metodou extrakce tuhou fází (SPE).<sup>21</sup>

V tabulce č. 1 jsou uvedeny příklady metod stanovení penicilinů.<sup>22, 23, 24, 25</sup>

**Tabulka č. 1:** Konkrétní příklady stanovení penicilinů.

Vzorek	Analyt	Kolona	Mobilní fáze	Eluce	Detekce
Tkáň z jater, ledvin a svalů skotu a prasat	AMOX, BP, ampicilin, oxacilin, cloxacilin, nafcilin, dicloxacilin	Waters Nova-Pak C <sub>18</sub> (150×3,9 mm, 4μm)	A - ACN/fosf. p. pH=6,5 10/100 (v/v) B - ACN/MeOH/fosf. p. pH=6,5 24/6/100 (v/v) C - ACN/MeOH/fosf. p. pH=6,5 30/20/100 (v/v) 80% A + 20 % B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100% B $\xrightarrow{19 \text{ min}}$ 100% C	Grad.	UV (323 nm)
Lidská plazma	FMP	Hawlett-Packard, XDB C-8 (150×4,5 mm, 5 μm)	A - fosf. p. B- ACN + MeOH (1:1) A/B 80/20 (v/v)	Izokr.	UV (220±2 nm)
Kravné mléko	AMOX, BP, ampicilin, oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin	Waters Nova-Pak C <sub>18</sub> (150×3,9 mm, 4 μm)	A - ACN/fosf. p. pH=9 10/100 (v/v) B - ACN/fosf. p. pH=9 30/100 (v/v) 100% B $\xrightarrow{13 \text{ min}}$ 100% A $\xrightarrow{2 \text{ min}}$ 100% B	Grad.	UV (323 nm)
Vepřová tkáň, mléko, krmení	AMOX, BP, FMP, ampicilin, oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin, nafcilin	Waters Symmetry C <sub>18</sub> (150×3,0 mm, 5μm)	A - 0,2% HCOOH v H <sub>2</sub> O B - 0,2% HCOOH v ACN/H <sub>2</sub> O 9/1 (v/v) 85% A + 15% B $\xrightarrow{7 \text{ min}}$ 50% A + 50% B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 30% A + 70% B	Grad.	MS

### 2.8.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - high performance liquid chromatography) je kvalitativní i kvantitativní separační metoda. Je to metoda založená na rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. K zajištění dostatečného průtoku mobilní fáze je nutno aplikovat přetlak.

Výsledkem analýzy je tzv. chromatogram - záznam odezvy detektoru na čas. Jednotlivým separovaným látkám odpovídají jednotlivé píky v chromatogramu. Je z něj možno určit hodnoty parametrů charakterizující retenční chování analytů a parametry detekovaných chromatografických píků. Retenční čas analytu,  $t$ , je časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce.<sup>26</sup>

Parametry, popisující separaci, použité v kapitole Výsledky a diskuze jsou: retenční faktor,  $k$ , který udává, kolikrát delší dobu stráví analyt ve stacionární fázi než v mobilní, definovaný výrazem:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

$t_R$ .....retenční čas analytu

$t_M$ .....mrtvý čas kolony

Rozlišení,  $R$ , charakterizující míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků, definované výrazem:

$$R = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (Y_2 + Y_1)} \quad (2)$$

$t_{R,2}, t_{R,1}$ .....retenční časy

$Y_2, Y_1$ .....šířka píku při základně



### 3. Experimentální část

#### 3.1. Přístroje a pomůcky

##### Molekulová absorpční spektrometrie

K proměření absorpčních spekter byl použit spektrofotometr Helios  $\alpha$  dodaný firmou Chromspec, Praha, Česká republika. Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 200 – 600 nm pomocí programu Vision 32. Bylo měřeno v křemenných kyvetách oproti methanolu.

##### Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro separaci při izokratické eluci byl použit systém HPLC s pumpou Delta Chrom<sup>TM</sup> SDS 030 od firmy Watrex®, Praha, Česká republika, spektrofotometrickým detektorem Spectra 100 od firmy Thermo Separation Product, New Jersey, USA, dávkovacím ventilem Rheodyne s dávkovací smyčkou 20  $\mu$ l, Cotati, CA, USA. Data byla zpracována počítačovým programem Clarity, verze 2.1., Watrex®, Praha, Česká republika a poté převedena do programu Origin, verze 6.1.

Pro separaci při gradientové eluci byl použit systém „The Waters Alliance System“ od firmy Waters Chromatography, Milford, MA, USA. Systém byl složen ze separačního modulu Waters 2695, detektoru Waters 2996 Photodiode Array Detector, dávkovače Waters 717 Plus Autosampler, kolonového termostatu Waters Alliance Series Column Heater. Data byla zpracována počítačovým programem Empower.

##### Kolony

Kolona Symmetry® C<sub>18</sub> o rozměrech 4,6×7,5 mm, velikosti částic 3,5  $\mu$ m od firmy Waters, Milford, MA, USA.

Kolona C<sub>18</sub> 5micron Spherical o rozměrech 250×4,6 mm, velikosti částic 5  $\mu$ m od firmy Astec, Whippany, USA.

#### Injekční stříkačka

K dávkování vzorků byla použita injekční stříkačka o objemu 25 µl od firmy Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko.

#### Ultrazvuková lázeň

Pro odvzdušnění mobilních fází byla použita ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo.

#### Váhy

K navážení standardů derivátů penicilinu byly použity analytické váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko.

#### pH metr

Hodnoty pH byly zjištěny pomocí pH metru PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie. Od stejné firmy byly dodány i kalibrační pufry.

### 3.2. Použité chemikálie

Deionizovaná voda upravená zařízením pro přípravu ultra čisté vody deionizací Ultrapur, výrobce Watrex®, Praha, Česká republika.

Methanol Chromasolv® for high-performance liquid chromatography, Acetonitril R Chromasolv® for liquid chromatography, výrobce Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo.

Kyselina mravenčí 98%, Lachema, Brno, Česká republika.

Vzorky amoxicilinu, benzylpenicilinu, fenoxymethylpenicilinu a 4-hydroxyfenoxymethylpenicilinu byly dodány jako standardy: Amoxicillin firmou Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo, Benzylpenicillin sodium CRS, Phenoxymethylpenicillin potassium CRS a 4-hydroxyphenoxymethylpenicillin CRS od European Pharmacopoeia, Strasbourg, Francie.

### 3.3. Příprava vzorků

Každý roztok vzorku byl připraven navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml methanolu, takže výsledné koncentrace byly  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Roztoky byly dány na 10 min do ultrazvukové lázně a roztok amoxicilinu byl ještě filtrován filtrem o průměru  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ . Pro proměření absorpčních spekter byly použity vzorky 100x zředěné, tedy o koncentraci  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , které byly připraveny odpipetováním  $100 \text{ } \mu\text{l}$  vzorku a přidáním  $9,9 \text{ ml}$  methanolu.

### 3.4. Použité mobilní fáze

V tabulce č. 2 jsou shrnuty mobilní fáze a kolony použité při optimalizaci separace derivátů penicilinu metodou HPLC.

**Tabulka č. 2:** Použité mobilní fáze.

Kolona Symmetry® C <sub>18</sub>	Kolona C <sub>18</sub> 5micron Spherical
ACN/H <sub>2</sub> O 80/20 (v/v)	ACN/H <sub>2</sub> O 60/40 (v/v)
ACN/H <sub>2</sub> O 60/40 (v/v)	ACN/H <sub>2</sub> O 40/60 (v/v)
ACN/H <sub>2</sub> O 40/60 (v/v)	ACN/H <sub>2</sub> O 10/90 (v/v)
ACN/H <sub>2</sub> O 20/80 (v/v)	ACN/0,1% HCOOH 60/40 (v/v)
	ACN/0,1% HCOOH 40/60 (v/v)
	ACN/0,1% HCOOH 30/70 (v/v)
	ACN/0,1% HCOOH 20/80 (v/v)
	ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v)

### 3.5. Separační podmínky

Separace probíhala za laboratorní teploty. Rychlost průtoku mobilní fáze byla  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Vlnová délka pro detekci byla zvolena 208 nm. Tlak mobilní fáze na kolonu se měnil v závislosti na použité mobilní fázi. pH 0,1% roztoku kyseliny mravenčí bylo 2,632.

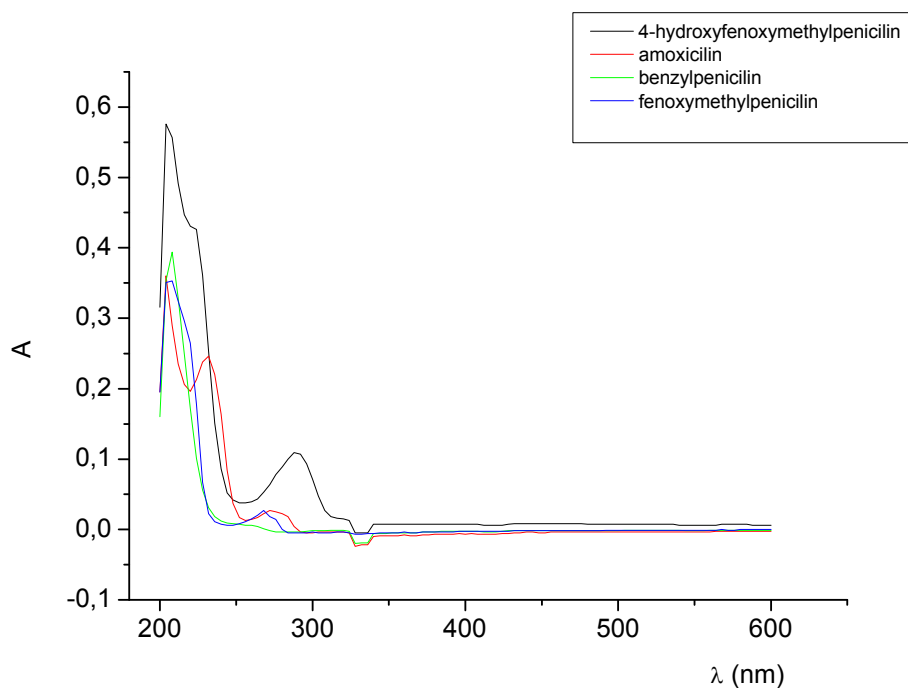
## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Výběr vlnové délky pro detekci

Při proměřování maxima absorbance v UV-VIS oblasti vlnových délek se hodnoty vzorků příliš nelišily. Maximální hodnoty se pohybovaly v rozmezí 200 nm až 210 nm, jak je uvedeno v tabulce č. 3 a lze vyčíst z obrázku č. 4. Pro detekci vzorků při HPLC byla vybrána vlnová délka 208 nm.

**Tabulka č. 3:** Vlnové délky při maximu absorbance.

Vzorek	Vlnová délka
BP	208 nm
FMP	208 nm
4-HFMP	204 nm
AMOX	204 nm



**Obrázek č. 4:** Spektra vzorků derivátů penicilinu.

## 4.2. Optimalizace separace

### 4.2.1. Kolona Symmetry® C<sub>18</sub>

Tato kolona nebyla vhodná k separaci penicilinů v testovaných mobilních fázích, protože nedocházelo k interakci mezi stacionární fází a analyty. Použité mobilní fáze jsou uvedeny v tabulce č. 1, viz kapitola 3.4. Postupně byl snižován obsah acetonitrilu v mobilní fázi, ale i přes to analyty eluovaly se systémovým píkem (resp. v mrtvém čase kolony). Pouze při použití mobilní fáze ACN/H<sub>2</sub>O 20/80 (v/v) došlo alespoň k malé retenci benzylpenicilinu ( $t = 1,157$  min) a fenoxymethylpenicilinu ( $t = 1,287$  min). Mobilní fáze s větším množstvím vody (95%) nebylo možno použít z důvodu možného poškození kolony.

### 4.2.2. Kolona C<sub>18</sub> 5micron Spherical

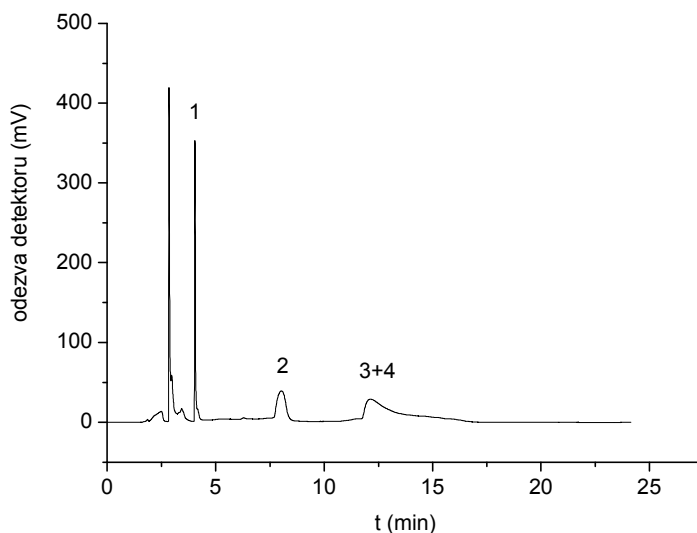
Tato kolona již byla vhodnější k separaci penicilinů, protože zde docházelo k interakci mezi stacionární fází a analyty. Všechny použité mobilní fáze jsou uvedeny v tabulce č. 2, viz kapitola 3.4.

Pořadí, v jakém analyty elují bylo zjištěno při použití mobilní fáze ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v) a jednotlivém dávkování analytů. Zjištěné separační pořadí je: amoxicilin, 4-hydroxyfenoxymethylpenicilin, benzylpenicilin a fenoxymethylpenicilin. V mobilních fázích s větším obsahem acetonitrilu docházelo k eluci se systémovým píkem. Mrtvý čas kolony, kterým byl retenční čas systémového (rozpouštědlového) píku, byl 2,882 min. Mrtvý čas kolony byl zjištěn nadávkováním jedné složky mobilní fáze (acetonitrilu). Nejvhodnější mobilní fáze měla složení ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v). Retenční časy analytů ukazuje tabulka č. 4.

**Tabulka č. 4:** Retenční časy analytů dávkovaných zvlášť při použití mobilní fáze ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v).

	AMOX	4-HFMP	BP	FMP
$t$ [min]	4,050	7,497	11,863	16,417

Jak je patrné z tabulky č. 4, retenční časy všech čtyř analytů jsou různé, proto by se dalo předpokládat, že se budou separovat i ve směsi. Obrázek 5 ukazuje separaci směsi penicilinů při použití mobilní fáze ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v). Amoxicilin a 4-hydroxyfenoxymethylpenicilin se podařilo rozseparovat až na základní linii. Avšak došlo ke koeluci benzylpenicilinu a fenoxymethylpenicilinu. V tabulce č. 5 jsou uvedeny retenční časy, retenční faktory a rozlišení píků ukázaných na obrázku č. 5.

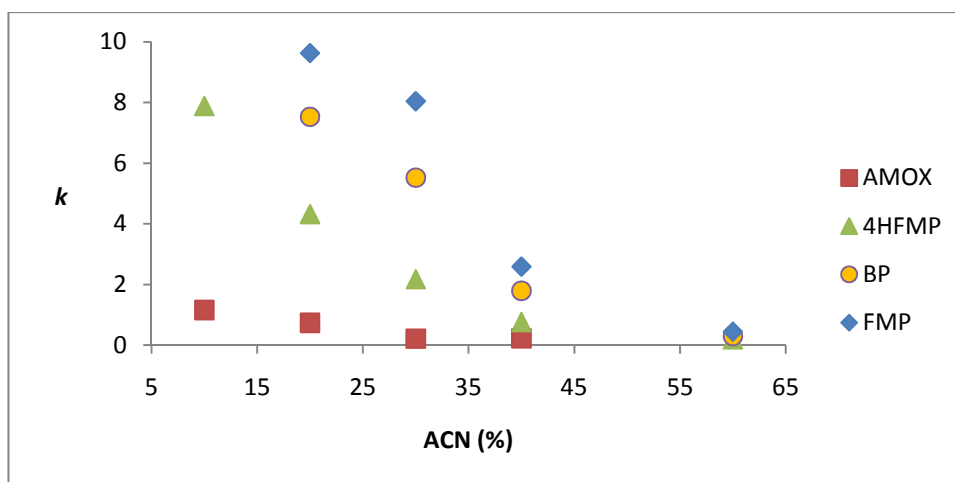


**Obrázek č. 5:** Separace směsi penicilinů na koloně C<sub>18</sub> 5micron Spherical v mobilní fázi ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v), detekce při vlnové délce 208 nm, separační pořadí: 1 - amoxicilin, 2 - 4-hydroxyfenoxymethylpenicilin, 3+4 - benzylpenicilin + fenoxymethylpenicilin.

**Tabulka č. 5:** Retenční časy, retenční faktory a rozlišení při separaci směsi mobilní fází ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v).

Pík	$t$ [min]	$k$	$R$
1 - AMOX	4,047	0,420	
2 - 4-HFMP	8,037	1,820	9,809
3+4 - BP + FMP	12,130	3,256	3,467

Z důvodu koeluce benzylpenicilinu a fenoxymethylpenicilinu v mobilní fázi ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v) byla pro další optimalizaci separace použita 0,1% kyselina mravenčí místo čisté vody. V mobilních fázích tvořených acetonitrilem a kyselinou mravenčí se zvýšila retence měřených analytů ve srovnání s mobilními fázemi tvořenými acetonitrilem a čistou vodou ve stejných objemových poměrech. V mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu analyty opět eluovaly brzy a ve fázi ACN/0,1% HCOOH 60/40 (v/v) amoxicilin stále eluoval se systémovým píkem kolony, naopak ve fázi s velkým množstvím vodné složky (0,1% kyselina mravenčí) ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v) analyty benzylpenicilin a fenoxymethylpenicilin neeluovaly do 90 min. Retenční časy se posouvaly v závislosti na poměru acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí v mobilní fázi, jak ukazuje tabulka č. 6. Na obrázku č. 6 je zobrazen graf závislosti velikosti retenčních faktorů analytů na složení mobilní fáze.



**Obrázek č. 6:** Závislost velikosti retenčního faktoru na složení mobilní fáze jednotlivě dávkovaných analytů.



**Tabulka č. 6:** Retenční časy jednotlivě dávkovaných analytů při průtoku různých mobilních fází.

$t$ [min] Mobilní fáze	AMOX	4-HFMP	BP	FMP
ACN/0,1% HCOOH 60/40 (v/v)	*	3,423	3,730	4,160
ACN/0,1% HCOOH 40/60 (v/v)	3,520	5,073	8,043	10,327
ACN/0,1% HCOOH 30/70 (v/v)	3,493	9,133	18,793	26,053
ACN/0,1% HCOOH 20/80 (v/v)	5,000	15,340	24,580	30,620
ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v)	6,213	25,613	n	n

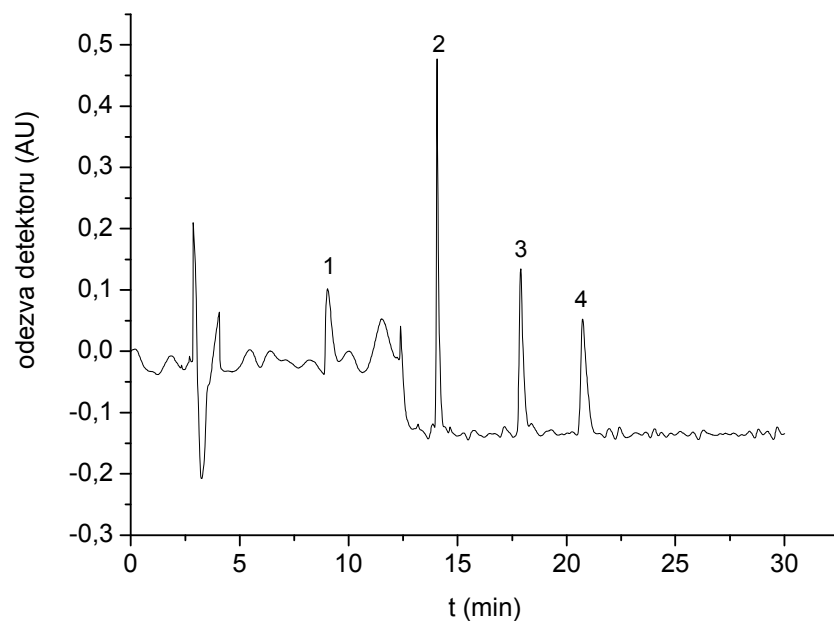
\*.....eluce se systémovým píkem

n.....neeluovaly do 90 min

Vzhledem ke koeluci benzylpenicilinu a fenoxymethylpenicilinu v mobilní fázi ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v) a k dlouhé retenci při použití mobilní fáze ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v) byla pro další optimalizaci separace použita gradientová eluce. Separace probíhala prvních sedm minut v mobilní fázi ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v) a během 7-9 min se lineárně měnila na ACN/0,1% HCOOH 40/60 (v/v). Celá separace probíhala při teplotě 25°C. V tabulce č. 7 jsou uvedeny retenční časy, retenční faktory a rozlišení píku ukázaných na obrázku č. 7.

**Tabulka č. 7:** Retenční časy, retenční faktory a rozlišení získané při separaci pomocí koncentračního gradientu.

Pík	$t$ [min]	$k$	$R$
1 - AMOXn	9,035	2,135	
2 - 4-HFMP	14,057	3,878	15,586
3 - BP	17,899	5,211	16,861
4 - FMP	20,745	6,198	7,304

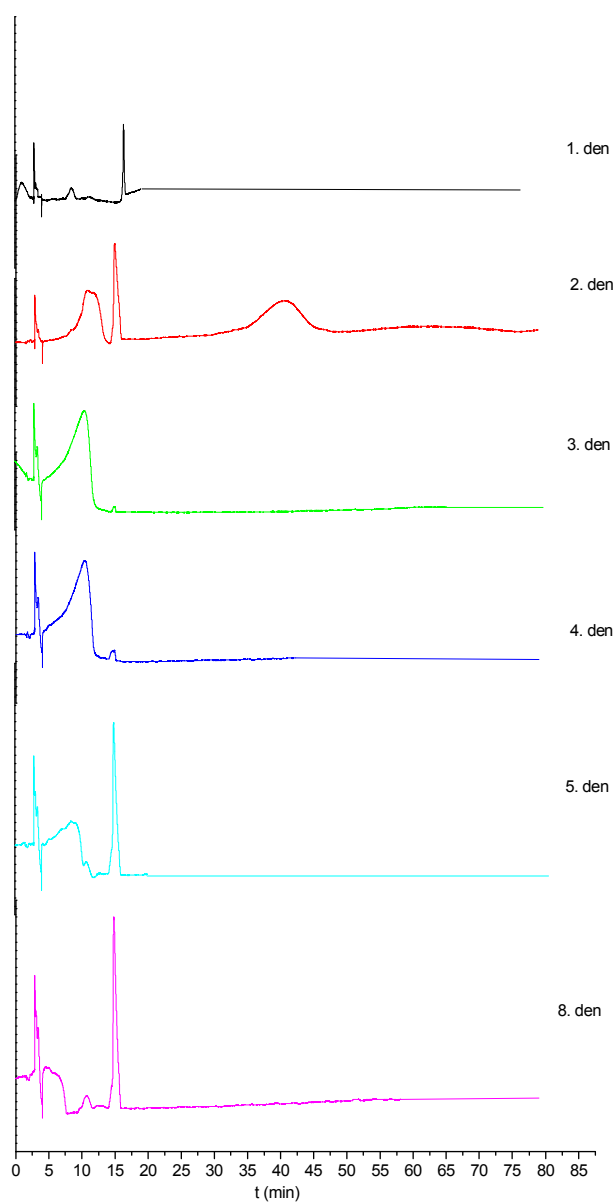


**Obrázek č. 7:** Separace směsi derivátů penicilinu pomocí koncentračního gradientu na koloně C<sub>18</sub> 5micron Spherical, detekce při vlnové délce 208 nm, separační pořadí: 1 - amoxicilin, 2 - 4-hydroxyfenoxymethylpenicilin, 3 - benzylpenicilin, 4 - fenoxymethylpenicilin.

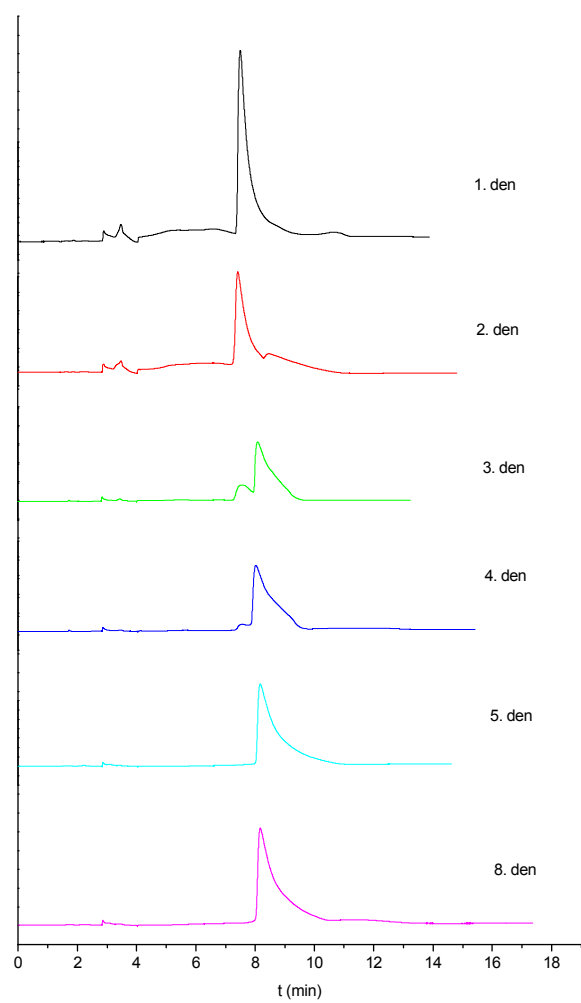
Použitím gradientové eluce se podařilo rozdělit všechny čtyři analyty na základní linii do 22 minut. Za těchto separačních podmínek se také zlepšila symetrie později elujících píků.

### 4.3. Stabilita methanolických roztoků penicilinů

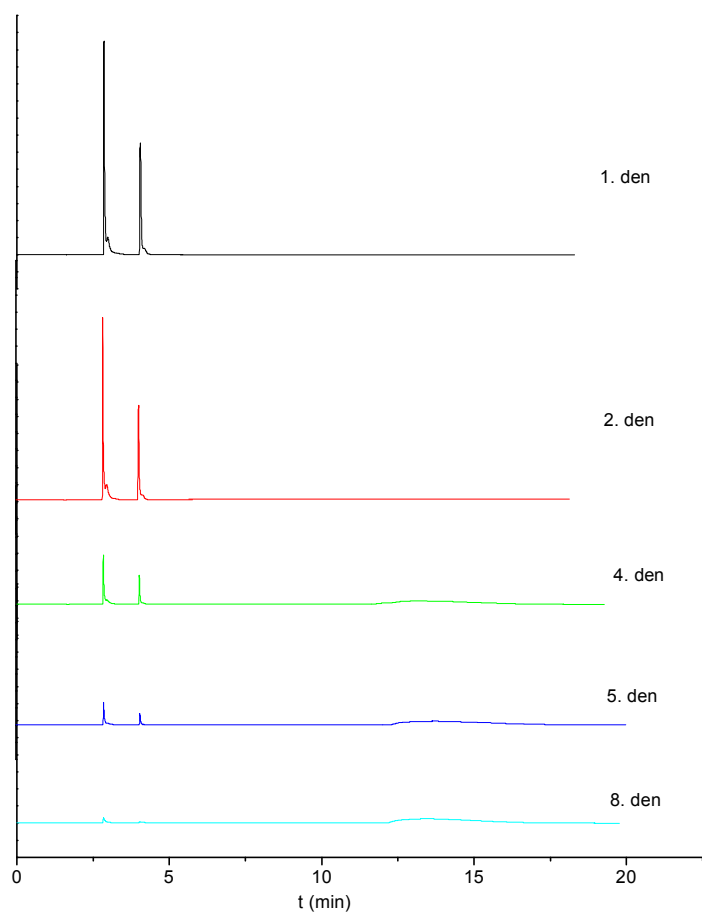
Během experimentální části bylo zjištěno, že některé deriváty penicilinu jsou v roztoku methanolu velice nestabilní. Methanolické roztoky jednotlivých vzorků derivátů penicilinu byly uchovávány v lednici. Stabilita těchto roztoků byla měřena v průběhu jednoho týdne (1. – 5. den) a poté za další dva dny (8. den). Již po 24 hodinách bylo možné pomocí HPLC sledovat rozklad roztoků derivátů penicilinu. Na obrázcích 8 a 9 je patrný vznik degradačních produktů fenoxymethylpenicilinu a 4-hydroxyfenoxymethylpenicilinu. Při testování stability roztoku amoxicilinu nejsou patrné žádné detekovatelné degradační produkty během prvních dvou dnů – viz obrázek 10. Z obrázku 10 lze vidět pouze snížení koncentrace amoxicilinu ve sledovaném vzorku, tzn. snížení výšky resp. plochy píku a od 4. dne se na chromatogramu zvýšila základní linie ve 12. minutě. Odezva tohoto "zvýšení" roste od 4. do 8. dne, dá se tedy předpokládat, že se jedná o možný degradační produkt/produkty. Postupné snižování plochy píku amoxicilinu je znázorněno na obrázku č. 11. Methanolický roztok benzylpenicilinu byl stabilní po celých osm dnů, nedocházelo ke vzniku degradačních produktů ani ke změně výšky nebo plochy píku.



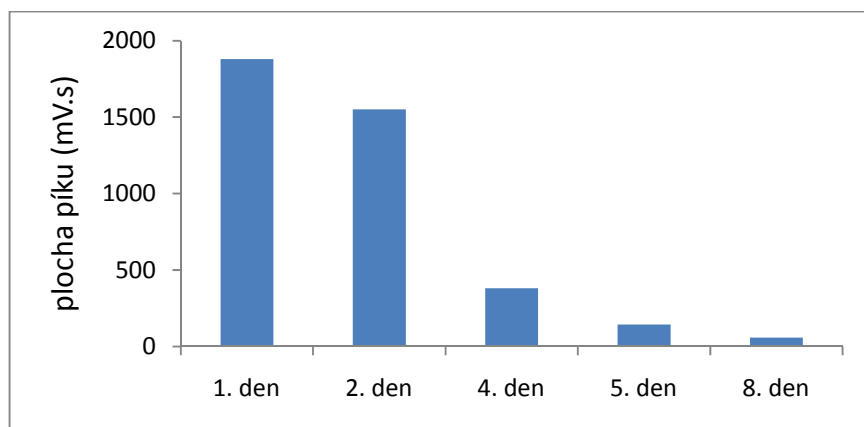
**Obrázek č. 8:** Stabilita fenoxymethylpenicilinu měřena na koloně C<sub>18</sub> 5micron Spherical v mobilní fázi ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v), detekce při 208 nm.



**Obrázek č. 9:** Stabilita 4-hydroxyfenoxymethylpenicilinu měřena na koloně C<sub>18</sub> 5micron Spherical v mobilní fázi ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v), detekce při 208 nm.



**Obrázek č. 10:** Stabilita amoxicilinu měřena na koloně  $C_{18}$  5micron Spherical v mobilní fázi ACN/ $H_2O$  10/90 (v/v), detekce při 208 nm.



**Obrázek č. 11:** Postupné snižování plochy píku amoxicilinu během osmi dnů.

## 5. Závěr

Separace směsi derivátů penicilinu (amoxicilin, 4-hydroxyfenoxymethylpenicilin, benzylpenicilin a fenoxymethylpenicilin) metodou RP-HPLC byla vyzkoušena na dvou chromatografických kolonách s oktadecylovou stacionární fází: kolona Symmetry® C<sub>18</sub> a kolona C<sub>18</sub> 5micron Spherical. Byl testován vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci analytů.

Kolona Symmetry® C<sub>18</sub> nebyla vhodná k separaci směsi derivátů penicilinu v použitých mobilních fázích, protože nedocházelo k interakci jednotlivých analytů se stacionární fází.

Druhá testovaná kolona C<sub>18</sub> 5micron Spherical byla mnohem vhodnější pro danou separaci. S klesajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi se prodlužoval retenční čas analytů, který ještě výrazně vzrostl nahrazením vody 0,1% kyselinou mravenčí. Izokratickou elucí mobilní fází o složení ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v) nebylo dosaženo úplné separace analytů, protože došlo ke koeluci benzylpenicilinu a fenoxymethylpenicilinu. Při záměně čisté vody za 0,1% kyselinu mravenčí - mobilní fáze ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v) benzylpenicilin a fenoxymethylpenicilin neeluovaly do 90 minut.

Z tohoto důvodu byla použita gradientová eluce, při které se podařilo rozseparovat všechny analyty na základní linii do 22 minut. Optimalizované separační podmínky jsou kolona C<sub>18</sub> 5micron Spherical, mobilní fáze: prvních sedm minut konstantní složení ACN/0,1% HCOOH 10/90 (v/v), od 7. do 9. minuty lineární gradient na ACN/0,1% HCOOH 40/60 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Studována byla také stabilita methanolických roztoků derivátů penicilinu. Bylo zjištěno, že v průběhu několika dnů se snižuje koncentrace standardů v roztoku, protože dochází k rozkladu na jejich degradační produkty. Výjimkou byl roztok benzylpenicilinu, který byl stabilní po celou dobu sledování stability.

## Použitá literatura

- 
- <sup>1</sup> Kuhn, D., Coates, C., Daniel, K., Chen, D., Bhuiyan, M., Kazi, A., Turos, E., Dou, Q. P.: Beta-lactam and their potential use as novel anticancer chemotherapeutics drugs. *Frontiers in Bioscience* 9 (2004), 2605-2617.
  - <sup>2</sup> Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. Překlad 5., přepracovaného a rozšířeného vydání. Praha, Grada 2007, str. 270-274.
  - <sup>3</sup> Fleming, A.: On the antibacterial action of cultures a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* 10 (1929), 226-236.
  - <sup>4</sup> Lange-Ernst, M. E.: Antibiotika. Omyly a pravda. Olomouc, Fontána 2005, str. 38-40.
  - <sup>5</sup> Joshi, S.: HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002), 795-809.
  - <sup>6</sup> Alekseev, V. G.: Acid-base properties of penicillins and cephalosporins. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 44 (2010), 14-24.
  - <sup>7</sup> Hampl, F., Moravcová, J., Čopíková, J., Opletal, L., Lapčík, O., Drašar, P.: Krása a rozmanitost struktur přírodních antibiotik. *Chemické Listy* 103 (2009), 15-27.
  - <sup>8</sup> Holm, A., Mosbech, H.: Challenge test results in patients with suspected penicillin allergy, but no specific IgE. *Allergy, Asthma et Immunology Research* (2011), 118-122.



- 
- <sup>9</sup> McGrane, M., O'Keeffe, M., Smyth, M. R.: Multi-residue analysis of penicillin in porcine tissue using matrix solid phase dispersion. *Analyst* 123 (1998), 2779-2783.
- <sup>10</sup> De Baere, S., De Backer, P.: Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 586 (2007), 319-325.
- <sup>11</sup> Khachatourians, G. G.: Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal* 159 (1998), 1129-1136.
- <sup>12</sup> Šídlová, P., Podlipná, R., Vaněk, T.: Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chemické Listy* 105 (2011), 8-14.
- <sup>13</sup> Batt, A. L., Aga, D. S.: Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry* 77 (2005), 2940-2947.
- <sup>14</sup> Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K. L.: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225 (1999), 109-118.
- <sup>15</sup> Yang, S., Carlson, K.: Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Research* 38 (2004), 3155-3166.
- <sup>16</sup> Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, Y., Chang, H., Jin, F.: Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research* 42 (2008), 307-317.

- 
- <sup>17</sup> Deshpande, A. D., Baheti, K. G., Chatterjee, N. R.: Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current Science* 87 (2004), 1684-1695.
- <sup>18</sup> Wildfeuer, A., Röder, K.: Stability of  $\beta$ -lactamase inhibitors and  $\beta$ -lactam antibiotics in parenteral dosage forms and in body fluids and tissue homogenates: a comparative study of sulbactam, clavulanic acid, ampicillin and amoxycillin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 6 (1996), 31-34.
- <sup>19</sup> Marazuela, M. D., Bogialli, S.: A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 645 (2009), 5-17.
- <sup>20</sup> Liu, Ch., Wang, H., Jiang, Y., Du, Z.: Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879 (2011), 533-540.
- <sup>21</sup> El-Shahat, M. F., Burham, N., Abdel Azeem, S. M.: Flow injection analysis–solid phase extraction (FIA–SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam. *Journal of Hazardous Materials* 177 (2010), 1054-1060.
- <sup>22</sup> Sørensen, L. K., Snor, L. K., Elkær, T., Hansen, H.: Simultaneous determination of seven penicillins in muscle, liver and kidney tissues from cattle and pigs by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B* 734 (1999), 307-318.
- <sup>23</sup> Medvedovici, A., Ionescu, M., Mircioiu C., David, V.: Optimization of a liquid–liquid extraction method for HPLC–DAD determination of penicillin-V in human plasma. *Microchemical Journal* 72 (2002), 85-92.

- 
- <sup>24</sup> Sørensen, L. K., Rasmussen, B. M., Boison, J. O., Keng, L.: Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 694 (1997), 383-391.
- <sup>25</sup> Van Holthoon, F., Mulder, P. P. J., Van Bennekom, E. O., Heskamp, H., Zuidema, T., Van Rhijn, H. A.: Quantitative analysis of penicillins of porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (2010), 3027-3040.
- <sup>26</sup> Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: Základní analytická chemie. Praha, Karolinum 2007, str. 149-167.